

# PRODUCTION OF HIGH-PURITY FISH SCALE COLLAGEN SOLUBLE IN ACID

Patent number: JP5093000  
Publication date: 1993-04-16  
Inventor: SAKAI HIROMITSU; others: 03  
Applicant: NIPPON KASEI CHEM CO LTD  
Classification:  
- international: C07K15/20; A23J1/10; A23J3/04; C07K3/02; C07K15/08  
- european:  
Application number: JP19910278826 19910930  
Priority number(s):

## Abstract of JP5093000

PURPOSE: To provide a process for producing a high-purity acid-soluble collagen from fish scale in a state free from gelatin which is a depolymerized and denaturated collagen.  
CONSTITUTION: The objective process for producing an acid-soluble fish-scale collagen comprises the steps of deashing the fish scale; extracting an acid-soluble collagen from the deashed fish scale with an acidic aqueous solution; and recovering the extracted acid-soluble collagen, wherein the above steps are carried out at  $\leq 15$  deg. C.

1 family member for:  
JP5093000  
Derived from 1 application.

1 PRODUCTION OF HIGH-PURITY FISH SCALE COLLAGEN SOLUBLE IN ACID

Publication info: JP5093000 A - 1993-04-16

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 9 3 0 0 0

(43) 公開日 平成 5 年 ( 1 9 9 3 ) 4 月 1 6 日

| (51) Int. Cl. <sup>5</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|------|---------|-----|--------|
| C07K 15/20                 |      | 7731-4H |     |        |
| A23J 1/10                  |      | 7236-4B |     |        |
| 3/04                       | 501  | 7236-4B |     |        |
| C07K 3/02                  |      | 7731-4H |     |        |
| 15/08                      |      | 7731-4H |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全 4 頁)

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平 3 - 2 7 8 8 2 6          |
| (22) 出願日  | 平成 3 年 ( 1 9 9 1 ) 9 月 3 0 日 |

|          |   |
|----------|---|
| (71) 出願人 | 0 0 0 2 3 0 6 5 2<br>日本化成株式会社<br>福島県いわき市小名浜字高山 3 4 番地 |
| (72) 発明者 | 酒井 宏充<br>福島県いわき市小名浜字高山 3 4 番地 日<br>本化成株式会社研究所内        |
| (72) 発明者 | 斎藤 秀史<br>福島県いわき市小名浜字高山 3 4 番地 日<br>本化成株式会社研究所内        |
| (72) 発明者 | 久保 知義<br>東京都府中市栄町 3 丁目 1 1 番 1 3 号                    |
| (72) 発明者 | 白井 邦郎<br>東京都多摩市鶴牧 3 丁目 1 7 番 9 号 3 0 4                |
| (74) 代理人 | 弁理士 小林 正明   |

(54) 【発明の名称】 高純度の酸可溶性魚鱗コラーゲンの製造法

(57) 【要約】

【目的】 コラーゲンの変性した低分子化物であるゼラチンを含まない高純度の酸可溶性コラーゲンを魚鱗から製造する方法を提供する。

【構成】 魚鱗を脱灰する工程、脱灰された魚鱗から酸性水溶液で酸可溶性コラーゲンを抽出する工程、および抽出された酸可溶性コラーゲンを回収する工程とからなり、上記工程を 1 5 ℃ 以下で実施することからなる酸可溶性魚鱗コラーゲンの製造法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 魚鱗を脱灰する工程、脱灰された魚鱗から酸性水溶液で酸可溶性コラーゲンを抽出する工程、および抽出された酸可溶性コラーゲンを回収する工程とからなり、上記工程を 15℃以下で実施することからなる酸可溶性魚鱗コラーゲンの製造法。

【請求項 2】 脱灰をエチレンジアミン 4 酢酸、エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム、またはエチレンジアミン 4 酢酸 4 ナトリウムで行う請求項 1 記載の酸可溶性魚鱗コラーゲンの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、有機質産業廃棄物である魚鱗から各種医療用生体材料、化粧品材料等として有用な酸可溶性コラーゲンを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】マイワシ等の魚類は、水揚げ時や加工時に魚鱗が大量に剥離して排水中に混入する。排水による環境汚染防止のためには、排水中の魚鱗を濾過回収する必要がある。しかし魚鱗はそのままでは利用価値がなく、大部分はそのまま廃棄されているのが現状である。

【0003】魚鱗は、通常灰分を約 50% 強、蛋白質を約 40% 弱含有する。灰分の殆どはリン酸カルシウム（ヒドロキシアパタイト）からなり、蛋白質の約 80% はコラーゲンであることが知られている。従来魚鱗からコラーゲンを抽出する方法としては、魚鱗から直接熱水で抽出する方法、直接酢酸で抽出する方法が知られている【日本水産学会誌 54（11）、1987-1992（1988）】。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】魚鱗から直接熱水でコラーゲンを抽出する方法では、コラーゲンの低分子化物ゼラチンが得られ、直接酢酸でコラーゲンを抽出する方法ではコラーゲン中にゼラチンが含有される。このためコラーゲンの純度が低いという問題点を有する。本発明の目的は、コラーゲンの変性した低分子化物であるゼラチンを含まない高純度の酸可溶性コラーゲンを魚鱗から製造する方法にある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、魚鱗を脱灰する工程、脱灰された魚鱗から酸性水溶液で酸可溶性コラーゲンを抽出する工程、および抽出された酸可溶性コラーゲンを回収する工程とからなり、上記工程を 15℃以下で実施することからなる酸可溶性魚鱗コラーゲンの製造法を提供する。

【0006】本発明は、魚鱗から抽出したコラーゲンが温度に対して敏感な挙動を示し、変性して低分子化ゼラチンとなることに着目し、酸可溶性魚鱗コラーゲン製造の主工程、好ましくは全工程を 15℃以下、より好ましくは 4～5℃の温度条件下で実施することを特徴の一つ

とする。

【0007】原料とする魚鱗は、鮮度を保持するため、冷蔵保存好ましくは冷凍保存しておくことが好ましい。採取された魚鱗にはかなりの夾雑物、例えば背鰭、尾鰭等が混入しているため、水洗して予めそれらを取り除いておくことが好ましい。また魚鱗表面に付着している余剰蛋白質を除去するため、8～12重量%、好ましくは 9～11重量%の塩化ナトリウム水溶液で 10～48時間、好ましくは 24～48時間洗浄することが好ましい。洗浄後の廃液はかなりの懸濁液となるため、洗浄廃液が濁らない程度まで繰り返すのがよい。好ましくは 3～5回洗浄液を交換して洗浄するのがよい。魚鱗の洗浄状態を見て適宜洗浄時間、洗浄回数を変えることが好ましい。上記洗浄工程も 15℃以下で実施するのが好ましい。

【0008】洗浄した魚鱗の脱灰工程にはキレート剤で調整した緩衝液を用いる。キレート剤としてはエチレンジアミン 4 酢酸、エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム、およびエチレンジアミン 4 酢酸 4 ナトリウム等（以下 EDTA と総称する）が例示される。EDTA 緩衝液は pH 6.0～8.0 の範囲とするのが好ましい。より好ましくは pH 7.0～7.5 である。pH が上記範囲より低いまたはより高い場合にはコラーゲンの変性が生じ易いので好ましくない。緩衝液中の EDTA 濃度は、0.3～0.6 モル／リットル、より好ましくは 0.4～0.5 モル／リットルである。

【0009】EDTA 緩衝液に洗浄済みの魚鱗を加え、脱灰する。魚鱗と EDTA 緩衝液の比率は、重量／容積比で 1：15 から 1：25、より好ましくは 1：18 から 1：23 に調整される。脱灰は 24～48 時間、より好ましくは 36～48 時間実施する。脱灰が不十分であると、酸可溶性魚鱗コラーゲンの抽出量も不十分となる。このため上記脱灰工程を 3～5 回繰り返して実施するのが好ましい。一度目の脱灰工程で約 90 重量%、三度目までの脱灰工程で約 95 重量%以上が脱灰される。脱灰後の廃液は非常に粘性が高い。このため、試料と廃液の分離には、遠心分離、濾過等を利用するのが好ましい。好ましい操作としては、遠心分離ついで濾過するのがよい。濾過に要する時間を短縮でき、かつ試料の損失を軽減できるからである。

【0010】脱灰して得られた粗魚鱗コラーゲンは、コラーゲン抽出工程に入る前に、緩衝液で洗浄して pH を調整するのが好ましい。緩衝液としては、例えばリン酸水素 1 ナトリウム、リン酸水素 2 ナトリウムとから調整したモル／15 リン酸緩衝液（pH 約 8.0）が使用される。ついで、酸可溶性魚鱗コラーゲンを酸性水溶液で振盪抽出する。酸性水溶液は pH 1.0～5.0、好ましくは pH 2.0～4.0 に調整したものが好ましく使用される。酸性水溶液は、有機酸、鉱酸のいずれでもよく、例えば酢酸、塩酸等が例示される。pH が上記範囲より

低いときにはゼラチン化し、上記範囲を超えると収量低下を生ずるので好ましくない。粗魚鱗コラーゲンと酸性水溶液との比率は、重量／容積比で1：15から1：25、好ましくは1：18から1：23の範囲が好ましく採用される。

【0011】粗魚鱗コラーゲンを酸性水溶液に加え、24～48時間、好ましくは36～48時間浸漬して酸可溶性魚鱗コラーゲンを抽出する。抽出は1～5回、好ましくは3～5回酸性水溶液を交換して実施するのがよい。1回目の抽出操作でも酸可溶性魚鱗コラーゲンの約80重量%が抽出できる。

【0012】酸性水溶液に溶解した酸可溶性魚鱗コラーゲンと残渣の分離は、通常の物理的分離手段によればよいが、遠心分離法が好ましく採用される。残渣を分離した酸可溶性魚鱗コラーゲン溶液から、コラーゲンを線維化・析出し回収する方法は、豚皮や牛皮コラーゲンなどで行われている方法と同様に処理すればよい。即ち上記溶液中に塩化ナトリウムを加えて塩濃度を上昇させ線維化する。あるいは水酸化ナトリウムを加えてpHを中性付近に調整して線維化してもよい。

【0013】線維化したコラーゲンを例えば遠心分離法により回収し、ついで再び適量の酸性水溶液に溶解させ、モル／15リン酸緩衝液（pH7.5）あるいはイオン交換水のような中性液で透析して酸可溶性魚鱗コラーゲンを回収する。透析後、凍結乾燥して高純度の酸可溶性魚鱗コラーゲンが得られる。

【0014】以下本発明を実施例に基づきより詳細に説明する。例中、%は特にことわりのない限り重量%を示す。

#### 【0015】実施例

新鮮なマイワシの魚鱗100gを約5℃の水で水洗し、夾雑物を除いた後、10%塩化ナトリウム水溶液2リットルに入れ、4～5℃の温度条件下で24時間振盪し、上澄み液を遠心分離および濾過操作により分離除去した。この操作を液を交換して3回繰り返した後、水洗して洗浄魚鱗を得た。

【0016】洗浄魚鱗を0.5モルのエチレンジアミン

4酢酸4ナトリウム、0.05モルのトリスー塩酸（pH7.5）とから調整した0.5モルのEDTA緩衝液2リットルに入れて4～5℃の温度条件下で48時間振盪した。その後遠心分離および濾過操作により上澄み液を分離除去した。この操作をEDTA緩衝液を交換して3回繰り返した後水洗し、30.5gの粗魚鱗コラーゲンを得た。

【0017】この粗魚鱗コラーゲンにモル／15リン酸緩衝液（pH8.0）600ミリリットルを加え、4～5℃の温度条件下で振盪しながら洗浄し上澄み液を分離除去した後、0.5モルの酢酸水溶液600ミリリットルを加え、4～5℃の温度条件下で48時間振盪抽出して酸可溶性魚鱗コラーゲンの溶液を得た。この溶液を18,000rpmで30分間遠心分離して酸可溶性魚鱗コラーゲン溶液と残渣とに分離した。残渣を水洗した後、再び0.5モル酢酸溶液で振盪・抽出した。これを3回繰り返して酸可溶性魚鱗コラーゲン溶液約1.5リットルを得た。

【0018】酸可溶性魚鱗コラーゲン溶液に、最終濃度が5%となるように塩化ナトリウムを加えて塩濃度を調整した。これによって生成した線維状の沈澱を、4～5℃の温度条件下、18,000rpmで、30分間遠心分離した。得られた沈澱を再び0.5モル酢酸水溶液に溶解し、モル／15リン酸緩衝液（pH7.5）で溶解液を4～5℃の温度条件下で72時間透析した。凍結乾燥後、酸可溶性魚鱗コラーゲン線維化物2gを得た。

【0019】この酸可溶性魚鱗コラーゲン線維化物を、ソジウムドデシルサルフェイトーポリアクリルアミドゲル電気泳動（以後SDS-PAGEという）およびアミノ酸分析にかけた。SDS-PAGEにおいて、 $\alpha$ 鎖、 $\alpha_1$ 鎖、 $\beta$ 鎖などコラーゲン特有のバンドパターンを示し、ゼラチンの混入はなかった。アミノ酸分析においてもコラーゲン特有のアミノ酸組成を示しており、高純度の酸可溶性魚鱗コラーゲンであることが確認された。表1に豚皮コラーゲンおよび酸可溶性魚鱗コラーゲンのアミノ酸組成を示す。

【0020】

表1

| アミノ酸残基    | 豚皮<br>コラーゲン | 酸可溶性魚鱗<br>コラーゲン |
|-----------|-------------|-----------------|
| ヒドロキシプロリン | 125         | 63              |
| アスパラギン酸   | 45          | 52              |
| スレオニン     | 17          | 24              |
| セリン       | 36          | 40              |
| グルタミン酸    | 70          | 73              |
| プロリン      | 112         | 108             |
| グリシン      | 328         | 324             |
| アラニン      | 99          | 125             |
| 1/2シスチン   | 0           | 0               |
| バリン       | 22          | 19              |

5

6

|          |     |     |
|----------|-----|-----|
| メチオニン    | 4   | 1 0 |
| イソロイシン   | 1 2 | 8   |
| ロイシン     | 2 5 | 2 1 |
| チロシン     | 3   | 3   |
| フェニルアラニン | 1 3 | 2 2 |
| ヒドロキシリジン | 5   | 8   |
| リジン      | 3 0 | 3 2 |
| ヒスチジン    | 7   | 1 9 |
| アルギニン    | 4 7 | 5 2 |

注： $\alpha$  鎖のアミノ酸組成。アミノ酸 1 0 0 0 残基当たりの数値で示した。

【 0 0 2 1 】

性魚鱗コラーゲンを抽出する方法に比して、高純度の酸

【発明の効果】本発明によれば、従来の魚鱗から酸可溶

可溶性魚鱗コラーゲンが得られる製造法が提供される。